

05.7.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 26 AUG 2004

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 5月18日
Date of Application:

出願番号 特願2004-147993
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2004-147993]

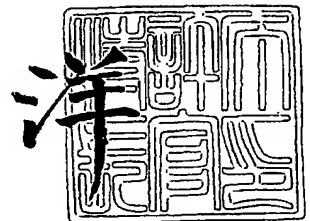
出願人 株式会社クボタ
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 8月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 T104060900
【提出日】 平成16年 5月18日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12M 1/00
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市向陽台五丁目 6 番 株式会社クボタ 環境エンジニアリング事業本部バイオセンター内
 【氏名】 江崎 聡
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県竜ヶ崎市向陽台 5 丁目 6 番 株式会社クボタ 環境エンジニアリング事業本部バイオセンター内
 【氏名】 白岩 由紀
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県竜ヶ崎市向陽台 5 丁目 6 番 株式会社クボタ 環境エンジニアリング事業本部バイオセンター内
 【氏名】 古和田 浩光
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市向陽台五丁目 6 番 株式会社クボタ 環境エンジニアリング事業本部バイオセンター内
 【氏名】 倉根 隆一郎
【特許出願人】
 【識別番号】 000001052
 【住所又は居所】 大阪府大阪市浪速区敷津東一丁目 2 番 4 7 号
 【氏名又は名称】 株式会社クボタ
【代理人】
 【識別番号】 100107308
 【住所又は居所】 大阪府大阪市北区豊崎 5 丁目 8 番 1 号
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 北村 修一郎
 【電話番号】 06-6374-1221
 【ファクシミリ番号】 06-6375-1620
【選任した代理人】
 【識別番号】 100114959
 【住所又は居所】 大阪府大阪市北区豊崎 5 丁目 8 番 1 号
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 山▲崎▼ 徹也
 【電話番号】 06-6374-1221
 【ファクシミリ番号】 06-6375-1620
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 049700
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

シリコン樹脂表面にオゾンを接触させるオゾン接触工程を行った後、前記シリコン樹脂表面に還元剤を接触させる還元剤接触工程を行うシリコン樹脂の表面改質方法。

【請求項 2】

前記還元剤接触工程を行った後、前記シリコン樹脂表面に表面機能修飾剤を接触させる表面機能修飾剤接触工程を行う請求項 1 に記載のシリコン樹脂の表面改質方法。

【請求項 3】

前記シリコン樹脂が、ポリジメチルシロキサン (PDMS) を主成分とする請求項 2 に記載のシリコン樹脂の表面改質方法。

【請求項 4】

前記還元剤が過酸化水素である請求項 1 ～ 3 に記載のシリコン樹脂の表面改質方法。

【請求項 5】

前記表面機能修飾剤がシランカップリング剤である請求項 2 又は 3 に記載のシリコン樹脂の表面改質方法。

【請求項 6】

前記オゾン接触工程において、前記樹脂表面に対してオゾンを、 0.8 g/h 以上で 1 ～ 3 時間処理する請求項 1 ～ 5 の何れか一項に記載のシリコン樹脂の表面改質方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】シリコン樹脂の表面改質方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、シリコン樹脂の表面改質方法であって、特に、バイオチップの構成材料であるシリコン樹脂の表面改質方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年のゲノム解析或いはプロテオーム解析を遂行する上で、大量のDNA或いはタンパク質を網羅的に解析するためにバイオチップが広範に導入され、核酸の配列情報の決定、遺伝子の発現・変異・多様性などの解析、および、目的タンパク質の精製・同定、タンパク質の発現・相互作用・翻訳後修飾等の機能解析に利用されている。このようなバイオチップとして、マイクロアレイ技術により製造されたDNAチップやプロテインチップが知られており、さらに、例えばDNAチップとして、複雑な流路や反応チャンバが形成してあるマイクロ流体デバイス等が知られている。

【0003】

マイクロアレイ技術は、ここ数年来、飛躍的な技術的進歩を遂げている。DNAチップは、例えば、DNAをガラス等の基板上に高密度に整列固定化することにより作製される。そして、この固定化DNAに対して、蛍光分子等で標識した標的核酸をハイブリダイゼーションさせ、基板上に結合した標識を蛍光スキャナー等で画像化し、解析処理することが行われる。

【0004】

また、マイクロ流体デバイスは、半導体等の微細加工技術(MEMS)を応用して製造されている。例えば、部材中に微小な毛細管状の流体流路、或いは、この流路と接続する反応領域としての反応チャンバ・電気泳動カラム・膜分離機構等の構造が形成される。このようなマイクロ流体デバイスは、主にDNA分析デバイス・微小電気泳動デバイス・微小クロマトグラフィーデバイス・微小センサー等のように、生体試料を測定する用途で利用される。

例えば、特許文献1には、シリコン基板の表面に異方性エッチングにより形成された複数の独立した反応チャンバと、シリコン基板の表面に陽極接合され反応チャンバを密閉する平板(耐熱ガラス)とからなるマイクロ流体デバイスが開示されている。このマイクロ流体デバイスを集積すれば、多数の生化学反応を同時に並列的に行うことができる。

【0005】

上述したように、バイオチップの構成材料としてガラスが利用されている。ガラスには、安価に入手でき、耐薬品性に優れているといった長所がある反面、加工が難しく、紫外線(UV)の吸収があるため検出系でUVを利用する用途には向かない等の欠点がある。

一方、ガラスの他にシリコン樹脂がバイオチップの構成材料として利用されているが、このシリコン樹脂のうち、成形容易性および光学的特性の観点から、特に、ポリジメチルシロキサン(polydimethylsiloxane:以下、PDMSと称する)が注目されている。

【0006】

PDMSは、透明性が極めて高く、光学的特性に優れており、広い波長領域での吸収が小さい。特に、可視光領域での吸収が極めて小さく、蛍光検出にもほとんど影響しない。このため、PDMSをマイクロ流体デバイスの基板として用いることにより、S/N値を低くできる。

更に、鋳型に対する追従性が高く、ナノからミクロンオーダーでの微細加工が容易であり、任意の微細構造に成形しやすいという特性を有している。この点で、各種光学機器に最適な形に微細加工できるという利点があるため、デバイス作製に対するコストパフォーマンスに優れている。

また、PDMSはそれ自体、ガラス・アクリル樹脂などと密着性がよい性質を有してお

り、微細加工を施されたPDMS基材に、平坦なガラス・アクリル樹脂部材を当接させることにより、接着剤等での接着等の接着手段を用いなくとも、流体流路やチャンバ等を形成することが可能となる。

【0007】

ここで、PDMSは、主成分はジメチルシロキサンであり、DNA及びタンパク質といった生体関連分子との親和性に乏しい不活性な官能基しか有しないため、PDMS基材表面は疎水性となって不活性な表面特性を有する。そのため、PDMS基材表面に、生体関連分子や、生化学反応に関わる各種化学物質等を固定するのが困難である。

【0008】

一方、生体関連分子は一般に親水性であるものが多く、水酸基、アミノ基、及び、カルボキシル基といった官能基との親和性は高い。そのため、PDMS基材表面がこれら官能基を持ち、例えば親水性で表面活性の高い特性を有すれば、生体関連分子を基材表面上に固定し易くなり、当該デバイス上での生化学反応をより確実に行えと考えられる。

【0009】

つまり、マイクロ流体デバイスを、生化学反応を行うリアクターとして用いる場合、生体関連分子や各種化学物質を直接基板表面に結合させることが重要となる。そのため、マイクロ流体デバイスの構成材料としてPDMSを採用した場合、例えば反応が行われるチャンバの表面を、生体関連分子や各種化学物質との親和性が向上するように親水化する等して、表面活性を向上させる改質を行うことが考えられる。

【0010】

このような表面特性改質として、例えば、非特許文献1には、PDMS基材表面に対して紫外線(UV)照射処理を行う、或いは、PDMS基材表面に対して紫外線-オゾン(UVO)処理により光オゾン酸化を行う技術が開示してある。これら処理により、PDMS基材表面に水酸基等を有するように改質できるため、PDMS基材表面を親水化することが可能となっていた。

【0011】

他にも、PDMS基材表面に対して強アルカリ処理を行う、或いは、プラズマ照射装置等を用い、PDMS基材表面に対して酸素ラジカル照射処理を行うことによりPDMS基材表面に水酸基が生成され、PDMS基材表面を親水化することができる。

【0012】

【特許文献1】特開平10-337173号公報(特許請求の範囲等参照)

【非特許文献1】K. エフィメンコ(K.Efimenko)、ウィリアム E. ワレス(William E. Wallace)、J. ジェンザー(J.Genzer)、“Surface Modification of Sylgard-184 Poly(dimethyl siloxane) Networks by Ultraviolet and Ultraviolet/Ozone Treatment”、Journal of Colloid and Interface Science 254, 306-315 (2002)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

上述したPDMS基材表面の特性改質において、PDMS基材表面に対してUV照射処理やUVO処理を行った場合(特許文献2)、或いは、強アルカリ処理を行った場合、PDMS基材表面にひび割れが発生して白濁し、透明性が著しく損なわれるという問題点があった。これは、PDMS基材表面に対する紫外線暴露により、PDMSの分子鎖が破壊されることに起因すると考えられる。

マイクロ流体デバイスをDNA分析デバイスとして利用した場合、当該デバイス上での生化学反応後に、色素或いは蛍光標識したDNAの検出を行うことがある。このとき、当該デバイスの透明性が損なわれていると、スキャナーでの蛍光検出が困難となり、正確なDNA分析を行うことができない。

【0014】

また、PDMS基材表面に対して酸素ラジカル照射処理を行った場合、生成した水酸基は安定せず、一過性の表面改質にしかならないという問題点があった。また、非常に高価

なプラズマ照射装置等を用いるため、製造コストが高くなるという問題点があった。製造コストが高いと、PDMSをマイクロ流体デバイスの構成材料として広く普及させるのに妨げとなる。

【0015】

従って、本発明の目的は、基材表面の活性化後も優れた透明性を維持し、コストパフォーマンスに優れたバイオチップを製造できるシリコン樹脂の表面改質方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

上記目的を達成するための本発明に係るシリコン樹脂の表面改質方法の第1特徴構成は、シリコン樹脂表面にオゾンに接触させるオゾン接触工程を行った後、前記シリコン樹脂表面に還元剤に接触させる還元剤接触工程を行う点にある。

【0017】

上記第1特徴構成によれば、シリコン樹脂表面にオゾンに接触させたとき、特に不飽和結合を有するシリコン樹脂表面に作用したオゾンにより、分子鎖を切断することなくオゾニドが形成される。分子鎖が切断されないことで、シリコン樹脂表面にひび割れが発生して白濁することがないため、樹脂の透明性が維持される。

そして、このようにオゾニドが形成されているシリコン樹脂表面に還元剤に接触させる。これにより、不安定なオゾニドを効率よく安定な水酸基やカルボキシル基に変換し、その結果、シリコン樹脂表面を親水化する改質ができる。このようにシリコン樹脂表面を親水化し、その後、例えば、アミノシランやポリー-L-リシン等のカップリング剤を結合させる等の処理を行うことにより、シリコン樹脂と生体関連分子や各種化学物質との親和性を増大させることが可能となる。このように、シリコン樹脂を親水化する改質が可能となれば、表面活性の高いシリコン樹脂への改質が容易に行える。

従って、生体関連分子や各種化学物質をシリコン樹脂表面上に固定し易くなり、シリコン樹脂上での生化学反応をより確実に行える。

また、本構成であると高価なプラズマ照射装置等を用いる必要が無いため、コストパフォーマンスに優れたバイオチップを提供できる。

【0018】

本発明に係るシリコン樹脂の表面改質方法の第2特徴構成は、前記還元剤接触工程を行った後、前記シリコン樹脂表面に表面機能修飾剤に接触させる表面機能修飾剤接触工程を行う点にある。

【0019】

上記第2特徴構成によれば、シリコン樹脂表面に生成した水酸基やカルボキシル基と、例えばアミノ基含有表面機能修飾剤とを反応させると、シリコン樹脂表面に、アミノ基等、種々の官能基を導入することができる。そのため、種々の表面機能修飾剤を使用することにより、多種類の生体関連分子や各種化学物質と親和性を有するシリコン樹脂を製造できる。従って、適用範囲の広いバイオチップの構成材料を提供することができる。

【0020】

本発明に係るシリコン樹脂の表面改質方法の第3特徴構成は、前記シリコン樹脂が、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を主成分とする点にある。

【0021】

上記第3特徴構成によれば、シリコン樹脂として、透明性・光学的特性・鋳型に対する追従性・加工容易性・密着性等の物理的に優れた特性を有するPDMSを好適に利用することができる。PDMSは安価に入手が容易であり、かつ、加工に要する手間を省力化できる。このため、コストパフォーマンスに優れたバイオチップ等を製造でき、ディスプレイ系を構築し易くなってコンタミネーションに関する問題も生じ難い。

【0022】

本発明に係るシリコン樹脂の表面改質方法の第4特徴構成は、前記還元剤が過酸化水素である点にある。

【0023】

上記第4特徴構成によれば、入手及び取り扱いが容易な還元剤として過酸化水素を利用できるため、シリコン樹脂表面の親水化を容易に行える。

【0024】

本発明に係るシリコン樹脂の表面改質方法の第5特徴構成は、前記表面機能修飾剤がシランカップリング剤である点にある。

【0025】

上記第5特徴構成によれば、入手及び取り扱いが容易な表面機能修飾剤としてシランカップリング剤を利用できるため、シリコン樹脂表面に対して、アミノ基やフェニル基等の生体関連分子と親和性の高い官能基の付与を容易に行える。

【0026】

本発明に係るシリコン樹脂の表面改質方法の第6特徴構成は、前記オゾン接触工程において、前記樹脂表面に対してオゾンを、0.8 g/h以上で1～3時間処理する点にある。

【0027】

後述の実施例にも示したが、本構成の条件でオゾン接触工程を行うことにより、表面活性化処理後も、シリコン樹脂(PDMS)は透明性を維持するという結果が得られている。従って、上記第6特徴構成によれば、短時間でオゾン接触工程を行うことができるため、コストパフォーマンスや効率面で優れたシリコン樹脂の表面改質方法となる。

【発明を実施するための最良の形態】**【0028】**

以下、本発明の実施例を図面に基づいて説明する。

本発明は、特にバイオチップの構成材料であるシリコン樹脂の表面改質方法であり、図1に示したように、シリコン樹脂表面にオゾンを接触させるオゾン接触工程を行った後、シリコン樹脂表面に還元剤を接触させる還元剤接触工程を行うことを特徴とする。

【0029】

シリコン樹脂は、一般にシリコンゴムと呼ばれる有機珪素ポリマーであり、シロキサン結合で構成される主鎖に結合する側鎖によりいくつかの種類がある。最も一般的なシリコン樹脂は、トリメチルシロキシを末端基とするポリジメチルシロキサン(PDMS)である。ポリジメチルシロキサンの特性は、シリコン原子と結合したメチル基を、水素・アルキル・フェニル又は有機官能基で置換することによって種々変更することができる。

このPDMSは、安価に入手可能であり、透明性・光学的特性・鋳型に対する追従性、加工容易性・密着性等の物理的に優れた特性を有するため、生化学反応を行うマイクロ流体デバイスの素材として適している。尚、シリコン樹脂は、PDMSに限られるものではない。

【0030】

PDMSの主成分はジメチルシロキサンであるが、これだけでは重合は起こらず、側鎖にビニル基等を持つシロキサン化合物が入ることによって所々で架橋が起こり、網目構造を形成する。そして、例えばビニル基を含んだ重合剤により重合されると、分子鎖内に不飽和結合が形成されるため、後述するように、このPDMS基材の表面に作用したオゾンにより、分子鎖を切断することなくオゾニドを形成し易くなる。

尚、本明細書では、PDMSを主成分とする樹脂基材をPDMS基材と称する。本明細書では、「主成分」とは、樹脂成分中に50%以上、好ましくは70%以上含まれる成分を指し、適宜、他の物質を含んでもよい。そのため、PDMSが主成分となる範囲で、前記重合剤の他に種々の添加剤を添加することが可能である。

【0031】

上記シリコン樹脂表面は、通常、生体関連分子との親和性に乏しい。そのため、マイクロ流体デバイス上で生化学反応を好適に行うべく、表面特性の改質を行う。

【0032】

まず、シリコン樹脂表面にオゾンを接触させるオゾン接触工程を行う。このとき、特に

不飽和結合を有するシリコン樹脂表面に作用したオゾンにより、分子鎖を切断することなくオゾニドが形成される。分子鎖が切断されないことで、シリコン樹脂表面にひび割れが発生して白濁することがないため、樹脂の透明性が維持される。そして、オゾニドが形成されているシリコン樹脂表面に還元剤を接触させる還元剤接触工程を行った場合、不安定なオゾニドを効率よく安定な水酸基やカルボキシル基に変換し、シリコン樹脂表面を親水化する改質ができる。このようにシリコン樹脂表面を親水化する改質により、表面活性の高いシリコン樹脂に改質できる。従って、生体関連分子や各種化学物質をシリコン樹脂表面上に固定し易くなる。

【0033】

還元剤は、過酸化水素が好適に例示されるがこれに限られるものではない。その他の還元剤としては、例えば、硫化ナトリウム等が使用できる。

【0034】

還元剤接触工程を行った後、シリコン樹脂表面に表面機能修飾剤を接触させる表面機能修飾剤接触工程を行う。

この工程では、シリコン樹脂表面に生成した水酸基やカルボキシル基と、アミノ基やフェニル基を含有した表面機能修飾剤とを反応させ、シリコン樹脂表面に、アミノ基やフェニル基等、種々の官能基を導入することができる。そのため、多種類の生体関連分子や各種化学物質と親和性を有するシリコン樹脂を製造することが可能となる。

【0035】

表面機能修飾剤は、各種シランカップリング剤が好適に例示されるがこれに限られるものではない。シランカップリング剤は、例えば、アミノ基を導入する場合は3-アミノプロピルトリエトキシシラン等のアミノシランを、フェニル基を導入する場合は、フェニルトリエトキシシラン (PTES) 等のフェニルシランを、それぞれ使用できる。シランカップリング剤以外の表面機能修飾剤としては、例えば、ポリ-L-リシン等が好適に使用できる。

【実施例】

【0036】

以下に、本発明の実施例を図面に基づいて詳細に説明する。

<バイオチップ>

生体関連分子の一例であるDNAを固定するバイオチップは、種々の形態が適用できる。

例えば、基板(第1部材)38上にPDMS (Sylgard (登録商標) 184、ダウコーニング社製)を主成分として形成してあるPDMS基材(第2部材)39を付設してあるDNAチップ31がある(図2参照)。このPDMS基材39は、主成分であるPDMSの他に、後述する重合剤と添加剤とを成分として含んでいる。

PDMS基材39には、微小な毛細管状の流体流路36、37を形成する溝、これら流路と接続する反応領域としての反応チャンバ34a、34bを形成する凹部、反応液を注入する注入孔33、反応液(反応液)を排出する排出孔35等が微細加工してある。

つまり、基板38とPDMS基材39との間には、2つの部材によって包囲されることにより、試料が流通する空間(流体流路36、37)、及び、試料を担持できる反応領域となる空間(反応チャンバ34)が形成される。

基板38は、ガラスプレート等の固相担体等が適用できる。他に、固相担体としては、石英板、シリコンウェファーなどが好ましく例示される。

【0037】

そして、微細加工を施されたPDMS基材39と基板38とを緊密に接着させる。接着方法は、接着剤を塗布することにより接着可能であるが、PDMSはそれ自身、ガラス、アクリル樹脂などの平面に密着するという性質を有することから、一方の部材にPDMSを用い、他方の部材として例えば平らなガラスを用いる場合、ガラス用アルカリ洗剤等で有機物、ゴミなどを取り除けば接着剤なしで接着することが可能となる。

【0038】

また、バイオチップは上述した構成に限らず、PDMS基材に微細加工を施して、バーコード状に並列配置された反応空間を有するDNAチップとすることも可能である。

この場合、第1部材、第2部材共に平坦な板状体として構成され、第2部材は、その第1部材との接触面に、複数の一方向に延伸する溝がバーコード形状に並列形成される構成とする。

【0039】

尚、微細構造が施される部材を構成する基材としてPDMSを用いる場合には、PDMSは鋳型に対する追従性が高いので、鋳型を用いて形成する方法が特に好ましい。一旦鋳型を作製すると、簡便かつ安価に大量のチップを生産できるため、製造コストを削減することができる。鋳型の形成は、フォトリソグラフィ技術とエッチング技術を組合わせて行う等、公知の微細加工技術を適宜用いて行う。

このようにして作製された凹凸形状の空間構造をもつ鋳型を型枠内に固定化し、未架橋のPDMSを適当な重合剤及び添加剤と混合して型に流し込み、熱を加えて硬化させることで、鋳型構造をPDMSに転写する。このとき、硬化温度に応じて硬化時間を適宜設定する。硬化後、鋳型から剥離することにより、所望の構造の形状パターンを有するPDMS基板が作製できる。

本実施例では、重合剤としては、メチルヒドロジェンシロキサン (methyl hydrogen siloxane) を使用してある。このとき、PDMS：重合剤＝10：1程度の割合で混合するのが好ましい。

また、添加剤としては、3-アクリロキシプロピルトリメトキシシラン (KBM-5103) 等のメトキシ基を含有した粘着剤を0.1～2%になるように混合してある。これにより、PDMS基材に対するDNAの固定効率が向上することが期待できる。

【0040】

<PDMS基材表面改質>

上記PDMS基材39の表面を活性化させる実験を行った。

PDMS基材39の表面活性化は、例えば、図2に示したDNAチップ31の場合、少なくとも、反応チャンバ34表面、つまり、基板38とPDMS基材39とを接着させたときに基板38と対面するPDMS基材39の凹部表面に施す。流体流路36、37表面にも、適宜、表面活性化を施すことが可能であるが、流体流路36、37を単なる流体（試薬）の通路として捉えた場合、生体関連分子や各種化学物質との親和性が低い方が好ましい場合があるため、必ず表面活性化を施す必要はない。

【0041】

尚、「生体関連分子」とは、cDNA・PCR産物等のDNA断片、オリゴヌクレオチド・ポリヌクレオチド・ペプチド核酸等の核酸、タンパク質、ペプチド、糖、細胞、微生物等、が好ましく例示されるが、これらに限定されるものではない。

【0042】

以下に、PDMS基材表面を活性化させる処理を詳述する。尚、以下の実験に用いたPDMS基材は、流体流路や反応チャンバを形成する溝や凹部を設けない平板状の部材とした。

【0043】

このPDMS基材をオゾンに接触させる（オゾン接触工程）。PDMS基材に対するオゾンの接触は、オゾナイザ（ED-OG-R4：エコデザイン社製）により、放電管電圧75V、オゾン濃度0.8g/h（流量2L/分）で、1～3時間の条件で行った。

オゾン接触工程の後、PDMS基材を30%過酸化水素水に10分間或いは24時間浸漬した（還元剤接触工程）。

【0044】

その後、シランカップリング剤として3-アミノプロピルトリエトキシシランを含む50%エタノール溶液に、PDMS基材を10分間或いは24時間浸漬した（表面機能修飾剤接触工程）。シランカップリング剤は、pHを7.0又は4.5に調整したものをを用いた。また、シランカップリング剤は、室温又は75℃に加温して行った。

【0045】

その後、100%エタノールにPDMS基材を浸漬し、2分間攪拌する処理を2回繰り返すことにより、PDMS基材表面を洗浄する洗浄工程を行った。洗浄後、40℃、15分間の乾燥工程を行った。

【0046】

このように、オゾン接触工程・還元剤接触工程および表面機能修飾剤接触工程において、処理時間・温度条件等を種々変更して処理した基板サンプル1～7を作製した。

サンプル1～7を作製したときの実験条件を、表1に示した。

【0047】

【表1】

| | オゾン接触工程 | 還元剤接触工程 | 表面機能修飾剤接触工程 |
|---|---------|---------|---------------------|
| 1 | 1時間 | 10分間浸漬 | 10分間浸漬 (pH 7.0、室温) |
| 2 | 1時間 | 10分間浸漬 | 24時間浸漬 (pH 7.0、室温) |
| 3 | 1時間 | 10分間浸漬 | 24時間浸漬 (pH 7.0、室温) |
| 4 | 1時間 | 24時間浸漬 | 10分間浸漬 (pH 7.0、室温) |
| 5 | 1時間 | 10分間浸漬 | 10分間浸漬 (pH 4.5、室温) |
| 6 | 3時間 | 10分間浸漬 | 10分間浸漬 (pH 4.5、室温) |
| 7 | 3時間 | 10分間浸漬 | 10分間浸漬 (pH 4.5、75℃) |

【0048】

このとき、サンプル1～7の表面所見としては、全てのサンプルにおいて、透明性が維持されていると認められた。そのため、オゾン接触工程は、コストや効率等の観点から、1～3時間程度行うのが好ましいと考えられる。

【0049】

<表面改質したPDMSと生体関連分子との親和性>

表面改質処理を行ったPDMS基材39表面にDNAを固定し、生体関連分子であるDNAとの親和性の強度を調べた。

サンプル1の条件で表面改質したPDMS基材へのDNAの固定は、以下のようにして行った。

定法によりフルオレセインイソチオシアネート (FITC) で蛍光標識した $1 \text{ pmol} / \mu\text{L}$ のオリゴDNA溶液をPDMS基材の表面に塗布 (スポット) し、 120 mJ でUV照射して蛍光標識DNAを表面改質PDMS基材の表面に固定した。その後、純水で洗浄して固定していないDNAを除去し、40℃・20分間の乾燥を行った。

【0050】

このように蛍光標識DNAを固定したPDMS基材を、DNAマイクロアレイ専用スキャナーにて蛍光強度を吸光波長 550 nm 、励起波長 570 nm にて測定し、画像処理を行った。画像処理の結果を図3(c)に示す。尚、図3(a)の画像は、本発明のオゾン処理工程を行わない比較データ1、図3(b)の画像は、前記添加剤を混合してあるPDMS基材に本発明のオゾン処理工程を行わない比較データ2である。平均値を取るためにDNAのスポットは8点 (スポット1～8) 作成している。そして、画像処理した後のスポットが濃くなればDNAが効率よく固定化されていることを示している。

【0051】

PDMS基材表面に固定されたDNA濃度の測定結果 (表2) と、表面所見等による各サンプルの評価は以下のとおりである。

尚、DNAの濃度は、蛍光強度との標準曲線から計算した (参考: $\text{DNA濃度} = (\text{蛍光強度} + 3451.9) / 134647$)。また、蛍光強度は、8つのデータの平均値からバックグラウンドを引いた値である。表2のスポット1～8は、図3の各画像データにおいて、左上から左下を順にスポット1～4、右上から右下を順にスポット5～8とする。

【0052】

【表2】

| スポット | 比較データ1 | 比較データ2 | オゾン処理実行 |
|-----------------|--------|--------|---------|
| 1 | 741 | 17776 | 99399 |
| 2 | 429 | 21663 | 53431 |
| 3 | 533 | 22038 | 99822 |
| 4 | 1277 | 24208 | 99978 |
| 5 | 386 | 24783 | 67958 |
| 6 | 519 | 25664 | 46116 |
| 7 | 662 | 31013 | 85209 |
| 8 | 1665 | 30333 | 99194 |
| バックグランド | 259 | 1558 | 4123 |
| 蛍光強度 | 518 | 23126 | 77265 |
| DNA濃度 (pmol) | 0.03 | 0.20 | 0.60 |

【0053】

PDMS基材に添加剤を混合せず、オゾン処理もしない比較データ1（図3（a））においては、殆どDNAを固定できないことが明らかである。PDMS基材に添加剤を混合した比較データ2（図3（b））においては、僅かにDNAの結合能が見られる。一方、添加剤を混合し、オゾン処理を行った本発明の方法を適用したデータ（図3（c））においては、濃いスポットが検出されたため、高効率でDNAが固定化されているものと認められた。尚、何れの場合もPDMS基材の透明性は損なわれていない。

【0054】

以上より、本発明のオゾン処理工程を行うことにより、PDMS基材はDNAとの親和性が向上し、DNA固定能力が向上するように改質できたため、好適に分析が行えるバイオチップの基板素材を提供できると認められた。

【0055】

〔別実施の形態〕

上述した実施例において、PDMSを主成分とするシリコン樹脂を例示したが、これに限るものではない。例えば、アクリル樹脂のポリメタクリル酸メチル（poly methyl methacrylate、PMMA、ポリメチルメタクリレート）においても実施可能である。

【図面の簡単な説明】

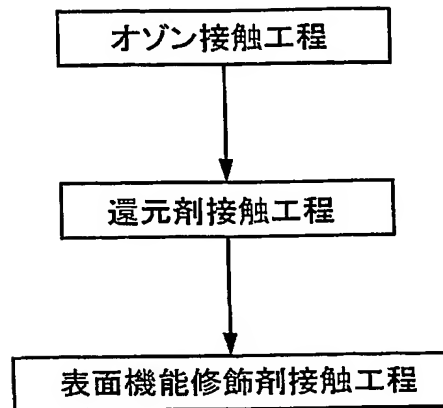
【0056】

【図1】本発明のシリコン樹脂の表面改質方法の工程を示した図

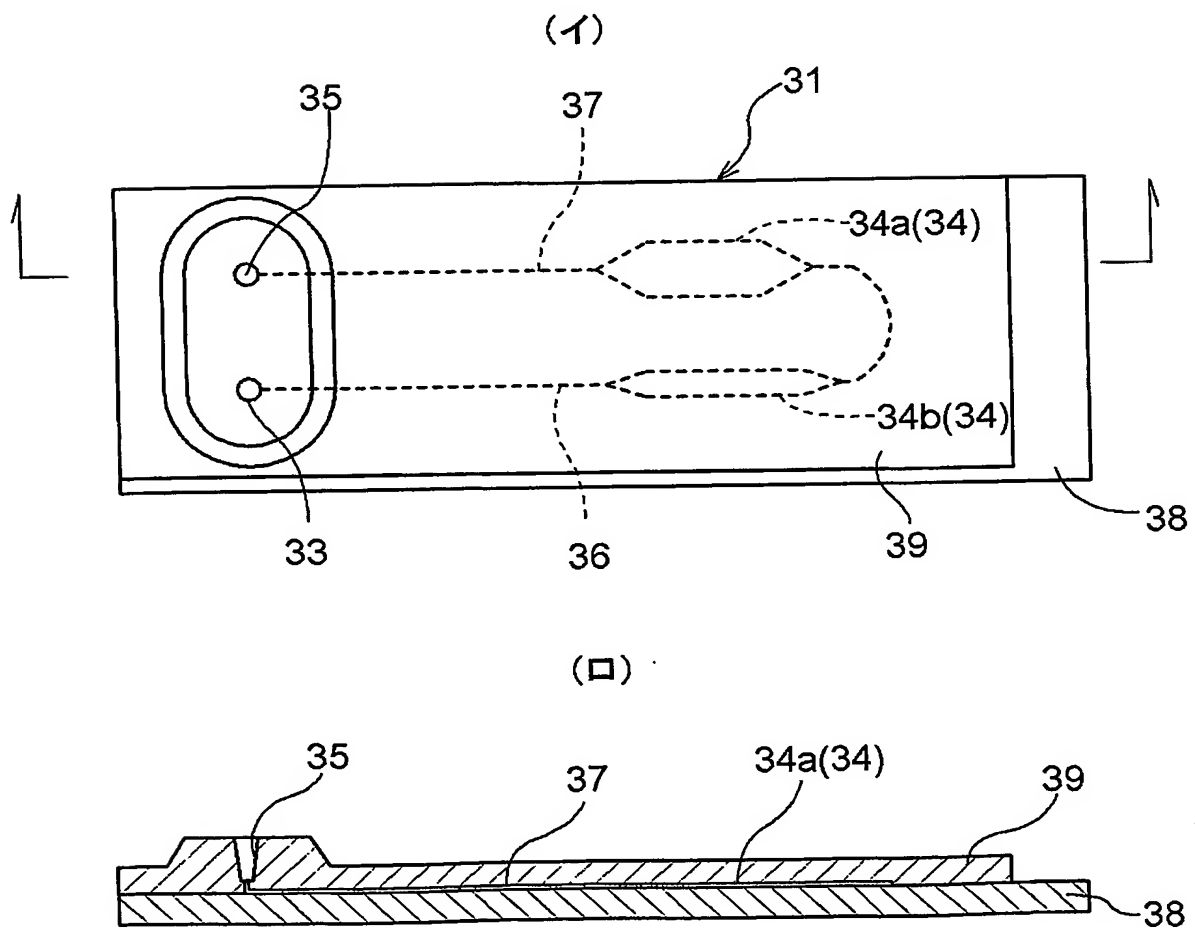
【図2】バイオチップの一例を示した図

【図3】PDMS基材表面に蛍光標識DNAを固定し、蛍光強度を測定した結果を示した図

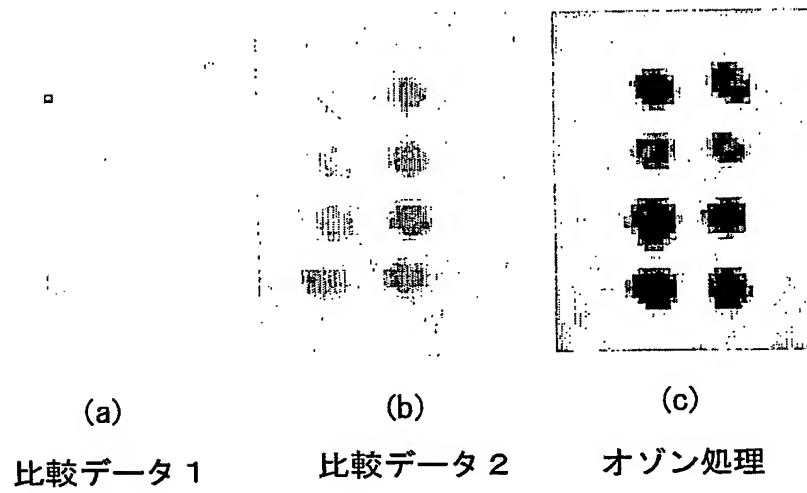
【書類名】 図面
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 基材表面の活性化後も優れた透明性を維持し、コストパフォーマンスに優れたバイオチップを製造できるシリコン樹脂の表面改質方法を提供する。

【解決手段】 シリコン樹脂表面にオゾンに接触させるオゾン接触工程を行った後、前記シリコン樹脂表面に還元剤に接触させる還元剤接触工程を行うシリコン樹脂の表面改質方法。

【選択図】 図 1

特願 2004-147993

出願人履歴情報

識別番号

[000001052]

1. 変更年月日
[変更理由]
住所
氏名

2001年10月11日
住所変更
大阪府大阪市浪速区敷津東一丁目2番47号
株式会社クボタ